

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Lokasi pengambilan sampel tanah berada di kawasan persawahan irigasi Kecamatan Bungaraya Kabupaten Siak, sedangkan isolasi dan identifikasi bakteri pelarut fosfat dilakukan di Laboratorium Patologi, Entomologi, dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau dan UPT. Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2017.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah, NaCl fisiologis, alkohol 70%, aquades, aluminium foil, kapas, kertas label, media *Pikovskaya* (PVK), *Nutrient Agar* (NA). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Global Position System* (GPS), bunsen, pipet volume, vortex, gelas beaker, mikroskop, autoclave, incubator, pH meter, cawan petri, *hot plate*, colony counter, *shaker*, batang kaca penyebar, erlenmeyer, thermometer, timbangan elektrik, *Laminar Air Flow* (LAF), oven, jarum ose, mikro pipet, tabung reaksi, meteran, parang, bor tanah, camera digital dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif kualitatif dengan metode observasi yaitu pengamatan langsung di lapangan dan menganalisis di laboratorium. Data yang dikumpulkan berupa data primer yaitu pengambilan sampel tanah sawah irigasi di Kecamatan Bungaraya Kabupaten Siak, kemudian mengisolasi, screening, pengamatan makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia serta identifikasi. Selain itu dikumpulkan pula data sekunder berupa peta lokasi dan data pendukung lainnya.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah sawah irigasi Kecamatan Bungaraya Kabupaten Siak diambil secara acak dengan kondisi yang homogen dengan metode *random sampling* pada 5 titik dengan menggunakan bor tanah pada kedalaman 0-10 cm,

11-20 cm dan 21-30 cm, kemudian dikompositkan berdasarkan kedalaman yang sama. Sampel tanah yang sudah diambil dimasukkan kedalam plastik sebanyak 100 gram (Saraswati dkk., 2007) dan ditutup rapat serta diberi label dan kemudian dibawa ke laboratorium.

3.4.2. Pengukuran pH Tanah

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Timbang 10 g tanah, setelah ditimbang masukkan kedalam labu erlenmeyer kemudian ditambah dengan aquades sebanyak 50 ml (pH H₂O). Tanah yang sudah dicampur dengan aquades dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 30 menit. Setelah dilakukan pengadukan selama 30 menit kemudian tanah diukur dengan menggunakan pH meter selama 5 menit (Fitrah, 2015).

3.4.3. Sterilisasi dan Pembuatan Media *Pikovskaya*

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Pensterilan alat dilakukan dengan metode panas kering yang menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam. Peralatan yang disterilkan dengan menggunakan oven adalah cawan petri untuk wadah media. Alat seperti jarum ose, pinset, dan batang kaca penyebar disterilkan dengan pembakaran (*flaming*) menggunakan bunsen. Untuk NaCl fisiologis, media agar PVK dan NA disterilkan menggunakan autoclave.

2. Pembuatan Media *Pikovskaya*

Niswati dkk. (2008) mengatakan preparasi pembuatan media *pikovskaya* dengan komposisi per liter sebagai berikut: 10 g Glukosa, 5 g Trikalsium fosfat (Ca₃)PO₄, 0.5 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g KCl, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, MnSO₄ (*trace*), FeSO₄ (*trace*), 0.5 g ekstrak ragi (*yeast extract*), dan 20 g agar bacto. Berdasarkan Saraswati dkk. (2007) berikut cara pembuatan media *pikovskaya* yang dilarutkan dalam aquades sampai volume 1 L.

Sterilisasi bahan media tersebut dengan autoclave pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit. Keluarkan media yang telah disterilkan dan dinginkan (didiamkan) sampai suhu mencapai 45-50°C. Tuang secara aseptik sebagian media ke dalam cawan petri steril, goyang atau geser supaya permukaan

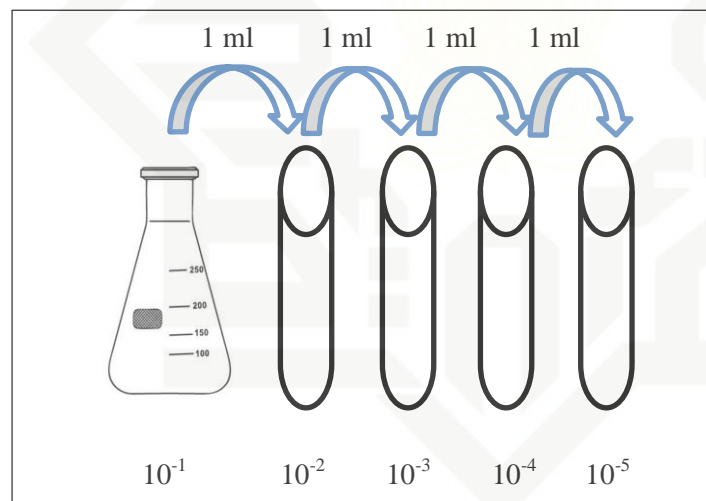
media merata dan diadkan sampai media padat atau beku. Media ini merupakan media agar *pikovskaya* untuk penanaman atau isolasi BPF.

3.4.4. Enumerasi dan Screening Bakteri Pelarut Fosfat

1. Pengenceran Sampel

Pengenceran berseri menggunakan larutan NaCl fisiologis steril 0,85%. Pengenceran bertujuan untuk memperkecil jumlah populasi bakteri. Pengenceran dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow*. Metode pengenceran dapat dilihat pada Gambar 3.1. Tahapan pengenceran berseri adalah sebagai berikut :

Sampel tanah sebanyak 10 g ditambahkan 90 ml NaCl fisiologis steril dan dihomogenkan menggunakan *shaker* pada kecepatan 100 rpm selama satu jam. Siapkan 4 tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl fisiologis 0,85% dan beri label. Ambil 1 ml dari tabung reaksi pengenceran 10^{-1} dengan pipet volume steril kemudian pindahkan ke tabung reaksi pengenceran 10^{-2} dan seterusnya dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-5} .



Gambar 3.1. Metode Pengenceran

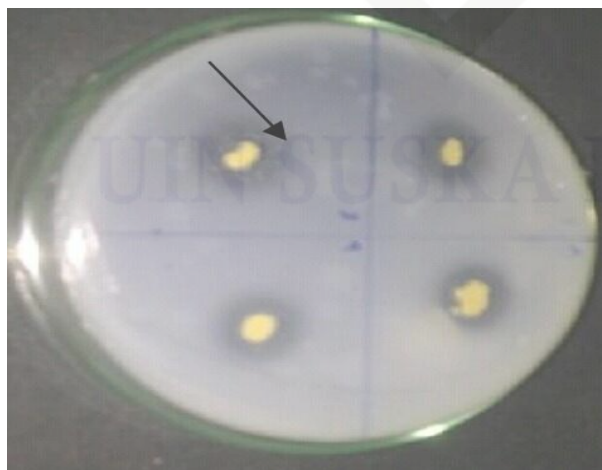
2. Penanaman Bakteri

Penanaman bakteri diambil dari 4 pengenceran dan setiap pengenceran diambil sebanyak 0,5 ml menggunakan mikro pipet steril. Pengenceran 10^{-2} - 10^{-5} ditetaskan pada media *pikovskaya* kemudian diratakan dengan menggunakan batang kaca penyebar. Setiap pengenceran di ulang dua kali. Selanjutnya petridish dimasukkan kedalam inkubator dengan posisi terbalik dan di inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 37°C.

Penghitungan jumlah koloni bakteri menggunakan metode cawan hitung. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan petri yang mengandung koloni bakteri antara 30-300 koloni, jika tidak ada pilih yang mendekati 300. Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan dalam media, maka mikroba tersebut akan berkembang dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop.

$$\text{Jumlah koloni/ml} = \frac{1}{\text{Vol. Sample}} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \times \text{Jumlah koloni dalam cawan}$$

Screening bertujuan untuk memisahkan bakteri berdasarkan ciri-ciri morfologinya. Koloni bakteri yang tumbuh dari hasil isolasi pada media *pikovskaya*, selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan teknik *point streak* pada media *pikovskaya* plate. Inkubasi selama 7×24 jam, kemudian amati kemampuan bakteri dalam melarutkan Trikalسيوم fosfat dengan ditandai zona bening (*holozone*) terluas pada media. Pengukuran diameter menggunakan penggaris, diukur diameter koloni dan diameter zona bening (Ruwandani dkk., 2014). Hasil uji kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat dinyatakan sebagai positif jika terlihat zona bening di sekitar koloni, dan negatif jika isolat tidak menunjukkan zona bening di sekitar koloni (Taniwan dkk., 2016). Lingkaran zona bening dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Diameter koloni dan zona bening diukur berturut-turut setelah 24 jam sampai 7 hari. Perhitungan nilai Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) berdasarkan metode (Karpagam and Nagalakshmi, 2014).

$$\text{Indeks Kelarutan Fosfat (IKF)} = \frac{\text{Diameter Koloni} + \text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Kategori indeks zona bening dapat dilihat pada Tabel 3.1. Sebagai berikut:

Tabel 3.1. Kategori Indeks Zona Bening

Indeks Zona Bening	Keterangan
$\geq 1,59$	Rendah
1,6 – 2,12	Sedang
2,15 – 2,59	Tinggi
2,6 – 3	Sangat Tinggi

Sumber: Ruwandani dkk., (2014)

5. Pemurnian Biakan

Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara koloni bakteri yang tumbuh diambil menggunakan jarum ose dan digoreskan pada permukaan media *Nutrient Agar* (NA). Media tersebut diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C sehingga didapatkan isolat murni (Marista dkk., 2013). Koloni bakteri yang tumbuh setelah tiga hari diamati morfologi makroskopisnya meliputi bentuk, warna, tepi dan elevasi koloni.

3.5. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat

3.5.1. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat secara Makroskopis

Pengamatan makroskopis bertujuan untuk mengamati koloni bakteri yang tumbuh pada media NA meliputi pengamatan bentuk, warna, tepi dan elevasi koloni, berdasarkan Tabel 3.2. Parameter pengamatan morfologi makroskopis menurut Hadioetomo (1993) sebagai berikut :



Tabel 3.2. Parameter Pengamatan Morfologi Makroskopis

Variabel	Kriteria
Bentuk koloni	Bulat, bulat dengan tepi bergelombang, bulat dengan tepi timbul, permukaan kusut, konsentrik, menyebar tidak teratur, filamen, bentuk-L, bulat dengan tepi berserabut, filiform, rhizoid, kompleks.
Tepi koloni	Halus, bergelombang, lobat, tidak teratur, sillat, bercabang, wool, benang, rambut.
Elevasi koloni	Datar, timbul, konveks, gunung, umbonat, berbukit, tumbuh ke dalam media, krateriform
Permukaan koloni	Mengkilat, tidak mengkilat
Warna koloni	Berwarna (sebutkan), tidak berwarna

Sumber: Hadioetomo (1993)

3.5.2. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat secara Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis bertujuan untuk mengamati pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri serta uji biokimia (Irfan, 2014). Pengamatan ini merupakan tahap yang paling penting dalam identifikasi bakteri.

A. Pewarnaan Gram Bakteri

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Gram positif merupakan organisme yang dapat menahan kompleks pewarnaan primer ungu *methylen blue* sampai pada akhir prosedur (sel-sel tampak biru gelap atau ungu), sedangkan Gram negatif adalah organisme yang kehilangan kompleks warna *methylen blue* pada waktu pembilasan dengan alkohol namun kemudian terwarnai oleh perwarna tandingan *safranin* (sel tampak merah muda) (Hadioetomo, 1993).

Bakteri yang digunakan yaitu bakteri yang berumur kurang dari 20 jam (Irfan, 2014). Prosedur kerja dari pewarnaan gram ini yaitu membersihkan *preparat glass* dengan menggunakan alkohol 70% kemudian di fiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah *preparat glass*. Sebelum pengambilan bakteri, pijarkan jarum ose pada bunsen kemudian dicelupkan kedalam aquades selanjutnya pijarkan kembali jarum ose dan diambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan diatas *preparat glass*, selanjutnya teteskan larutan zat warna *methylen blue* sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik, cuci dengan aquades dan keringkan *preparat* diatas bunsen, kemudian teteskan 1-2 tetes larutan *lugol* selama 1 menit kemudian bilas dengan alkohol 70 % dan dicuci dengan aquades,

terakhir tetes larutan *safranin* sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik kemudian bilas dengan aquades kembali dikeringkan dan diamkan, terakhir amati dibawah mikroskop (Fitrah, 2015). Hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

B. Uji Biokimia

Uji biokimia akan dilakukan sampai tingkat genus dan jika memungkinkan akan dilakukan sampai tingkat spesies. Uji biokimia akan merujuk berdasarkan buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Ninth Edition*.

1. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase pada bakteri. Pengamatan uji katalase dilakukan dengan cara mengambil satu ose biakan bakteri kemudian diletakkan pada gelas objek dan ditetesi *hydrogen peroksida* (H_2O_2) 3%. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara disekitar biakan koloni bakteri (Hadioetomo, 1993).

2. Uji Oksidasi

Uji oksidasi dilakukan untuk membantu mengidentifikasi kelompok bakteri dengan kemampuan bakteri menghasilkan oksidasi. Uji oksidasi dilakukan dengan menggunakan kertas *oxidase strip* dengan cara mengoleskan bakteri dalam cawan (Hadioetomo, 1993). Reaksi ditunggu selama 15 detik, hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

3. Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan asam. Isolat bakteri diambil 1 ose dan dimasukkan ke dalam *Phenol red broth glucoce* lalu diaduk. Media yang telah berisi isolat, diinkubasi selama 2 hari. Perubahan warna yang terjadi diamati, warna merah untuk mengindikasikan bakteri yang tidak menghasilkan asam dan warna kuning untuk mengindikasikan adanya asam (Pratita dan Putra, 2012).

4. Uji Motility

Uji motility dilakukan untuk mengetahui pergerakan bakteri, dinyatakan positif ditandai dengan pergerakan dan adanya kekeruhan pada media yang menunjukkan pertumbuhan bakteri (Hadioetomo, 1993). Isolat diinokulasi pada medium NA dalam tabung reaksi dengan cara ditusukkan ke dalam media. Inkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C. Motilitas bakteri ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri yang menyebar sedangkan non-motil jika pertumbuhan koloni bakteri hanya berbentuk garis (Pakpahan dkk., 2013).

5. Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan dextrose, laktosa, sukrosa dan pembebasan sulfida, selain itu uji TSIA berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menghasilkan gas, H₂S atau tidak. Media yang digunakan mempunyai dua bagian, yaitu miring (*slant*) dan tusuk (*butt*) (Kismiyati dkk., 2009). Inkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C. Perubahan yang diamati setelah inkubasi adalah warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa, warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H₂S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas (Sardiani dkk., 2015).

6. Uji Sulfide Indole Motility (SIM)

Media *Sulfide Indole Motility* (SIM) merupakan media semi solid berwarna krem. Isolat bakteri yang telah diperoleh diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM tegak, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam. Hasil positif (motil) pertumbuhan bakteri akan menyebar menjauhi garis inokulasi dan terjadi migrasi (pergerakan) didalam media sehingga media menjadi keruh (turbid) dan hasil negatif (non motil) pertumbuhan hanya terlihat di sepanjang garis inokulasi dan media tidak menjadi keruh (Ismail dan Fariedah, 2014). Selanjutnya pada masing-masing isolat ditambahkan beberapa tetes senyawa kovacks, untuk melihat produksi senyawa indol. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah (cincin merah) (Sardiani dkk., 2015).



Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

7. Uji *Simmon Citrate Agar* (SCA)

Uji Sitrat berfungsi untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal dan energi. Isolat diinokulasi pada medium miring SCA secara vertikal, dengan menggunakan metode goresan zig-zag pada bagian miring dan ditusukkan pada bagian dasar. Media diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi biru dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Anggraini dkk., 2016).

8. Uji Urea

Uji urea bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mempunyai enzim urease yang dapat menguraikan urea membentuk amoniak. Isolat diinokulasi pada medium urea dalam tabung reaksi secara vertikal dengan goresan zig-zag pada bagian miring dan ditusukkan pada bagian dasar. Media diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi pink dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Anggraini dkk., 2016).

9. Uji *Voges Proskauer* (VP)

Biakan diinokulasi pada medium *Voges Proskauer* (VP) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam, kemudian media ditambahkan *alpha-naphtol* 0,6 ml dilanjutkan 0,2 ml KOH 40% lalu dikocok selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu memfermentasikan glukosa (Anggraini dkk., 2016).

10. Uji *Methyl Red* (MR)

Uji *Methyl Red* (MR) bertujuan untuk mendeteksi kemampuan organisme dalam memproduksi dan mempertahankan produk akhir asam stabil dari fermentasi glukosa. Biakan ditanam pada medium MR dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam, kemudian media ditambahkan 5 tetes reagen MR. Tabung dikocok selama 30 detik. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Anggraini dkk., 2016).



11. Uji Fermentasi Karbohidrat

Pengujian fermentasi karbohidrat dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat pada media. Proses fermentasi karbohidrat akan menghasilkan sejumlah besar asam organik yang berasal dari tiap-tiap jenis gula, yaitu glukosa, laktosa, manitol, maltosa dan sukrosa. Media fermentasi karbohidrat merupakan media cair yang berwarna merah. Hasil positif apabila warna media berubah menjadi kuning (terjadi fermentasi karbohidrat) dan hasil negatif apabila tidak terjadi perubahan warna media (tidak terjadi fermentasi karbohidrat) (Ismail dan Fariedah, 2014).

3.6. Analisis Data

Data primer yang diperoleh dari lapangan dan hasil analisis laboratorium selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel dengan menggunakan *software Microsoft Excel 2007* yaitu data populasi bakteri, pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia serta melampirkan gambar bakteri yang didapat, selain itu dilengkapi juga dengan data sekunder berupa peta lokasi pengambilan sampel, pH tanah dan curah hujan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.